

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定
(H16-ゲノム-002)

平成 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 池田 康夫
慶應義塾大学医学部内科学 教授

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

抗血小板薬の反応性に関連する因子の同定

- I. 総合研究報告 池田 康夫

- II. 分担研究報告
 - 1. 動脈血栓症と関係する因子の研究 池田 康夫
 - 2. 抗血小板薬の反応性と関係する分子の解析 村田 満
 - 3. 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の検討と前向き調査研究の確立
鈴木 則宏
星野 晴彦
 - 4. 脳梗塞患者における抗血小板薬の効果判定と血小板 mRNA プロファイリング
棚橋 紀夫
 - 5. 全ゲノム解析による抗血小板薬の薬効を規定する遺伝子の同定 猪子 英俊
 - 6. マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から in vitro 分化誘導による巨核球分化・
血小板産生システムを用いた抗血小板薬の反応性に関連する因子の基礎検討
松原 由美子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- IV. 研究成果の刊行物・別冊

総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業

総合研究報告書

抗血小板薬の反応性に関連する遺伝子の同定

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科教授

研究要旨 血小板血栓が主体となり発症する冠状動脈疾患や虚血性脳血管障害は我が国の死亡原因の上位を占めており、これら疾患に対する再発予防や一次予防に抗血小板薬が頻用されている。しかし抗血小板薬の効果は個人差が大きいことが指摘されており、薬剤に対する反応性が乏しい「不応症」の患者では血栓の予防効果が低く再発率が高いことが大規模研究において示されている。したがって抗血小板薬に対する感受性の原因となる因子の検出が急務となっている。本研究の目的は、(A) 抗血小板薬の反応性に関与する因子の機能解析を行う、(B) 抗血小板薬の反応性の個体差に関与する遺伝子多型を網羅的解析および候補因子アプローチにより検出する、(C) 動脈血栓症と関連する因子の遺伝子多型を網羅的解析および候補因子アプローチにより検出する、(D) マウス ES 細胞・ヒト造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生法を用いた実験システムを確立する、ことであり、これら結果に基づき、抗血小板薬選択のための遺伝子診断システムを構築し、抗血小板療法の個別化医療を確立することを最終ゴールとしてスタートした。平成 16 年度は、対象者からの検体と臨床情報の蒐集、血小板機能評価、血小板発現遺伝子プロファイリング、全ゲノムスキヤンの基礎検討を主な目的とした。抗血小板薬服用者の *ex vivo* 血小板機能評価法、健常人血液に *in vitro* で抗血小板薬を添加した際の血小板機能評価法を確立した。対象者の DNA を抽出するとともに幾つかの候補遺伝子についての多型検索を行い疾患との関連を見いだした。また whole genome 解析の予備検討を行い、抗血小板薬反応性（凝集能など定量的値）を指標にした QTL マッピングのための、3 万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の準備が整った。マイクロアレーによる RNA 発現プロファイリングについても、血小板での実験の至適条件が見いだされた。平成 17 年度は、「抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子を検出するための網羅的解析、アスピリンとの関連が報告されている因子に着目した候補因子アプローチ」を主な目的として行った。健常人血液に *in vitro* でアスピリンを添加した際の反応性に

関与する遺伝子多型をマイクロアレイを用いた検討により検出した。脳血管障害に関与する遺伝子多型をマイクロアレイを用いた検討により検出した。候補因子アプローチとしてヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ミトコンドリア、dual specificity phosphatase に着目してそれらの機能検討や予備検討を行った。抗血小板薬反応性を指標にした QTL マッピングの基礎検討を行った。本研究の基礎実験としてマウス ES 細胞から in vitro で分化誘導した巨核球や血小板機能のアスピリンによる抑制やそれら細胞を用いて微少サンプルにおけるマイクロアレイ解析のプロトコールの確立を行った。平成 18 年度は、脳血管障害の疾患感受性に関連する遺伝子多型を網羅的に解析するための microarray を用いた case-control study を行い、その疾患感受性に関与する遺伝子多型を検出した、アスピリンの作用発現に関連の可能性のある hTERT の遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響を検討した結果、hTERT の-1327T/C 遺伝子多型が冠状動脈疾患患者における白血球テロメア長への関与を認めた、抗血小板薬服用者に対する good responder、poor responder における microarray 解析結果に基づいた遺伝子多型解析の結果、PFA-100®で評価したアスピリン感受性に関連する遺伝子多型を網羅的解析により検出した、血小板膜受容体のひとつである glycoprotein (GP) Ib alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に関連することを見いだした、慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の関係を詳細に解析した、ヒト造血幹細胞を用いた際の遺伝子改変巨核球・血小板を得るプロトコールを確立した。本研究により得られる成果は「抗血小板療法の個別化医療」において、抗血小板薬の効果予想の遺伝子診断、システムの構築、その実用化に向かうことと考えられる。抗血小板薬は世界中で大量に使用されている薬剤であり、抗血小板療法の個別化医療の実現は医療経済面からも甚だ重要であると考ええる。

分担研究者

村田 満 慶応義塾大学医学部
中央臨床検査部 教授
鈴木則宏 慶応義塾大学医学部
内科 教授
猪子英俊 東海大学医学部
基礎医学系分子生命科学
教授
棚橋紀夫 慶応義塾大学医学部
内科 講師
松原由美子 慶応義塾大学医学部
内科 講師

A. 研究目的

血小板血栓を主体とする冠状動脈疾患や虚血性脳血管障害は我が国の死亡原因の上位を占めており、これら疾患に対する再発予防、一次予防に抗血小板薬が頻用されているが、抗血小板薬の効果には個体差があり、抗血小板薬に対する反応性が悪い「不応症」では血栓の予防効果が低く再発率が高いことが示されている。従って抗血小板薬に対する responder、non-responder の原因を突き止めることが急務となっている。本研究は抗血小板薬の反応性の個人差の原因となる遺伝子を同定することを目的とした。抗血小板薬に対する responder、non-responder の原因については殆ど分かっていないことに加え、抗血小板薬の効果は、血小板以外にさまざま

な要因の影響を受けるため responder、non-responder の評価は抗血小板薬服用患者だけでなく健常人の血小板に in vitro で抗血小板薬を直接添加してその効果の違いを直接比較した。血小板機能評価と遺伝子の関係の解析においては候補因子アプローチと網羅的解析を行った。さらに本研究においては上記解析において検出された因子の分子機序の解明のため、幹細胞に遺伝子改変を行い in vitro 分化誘導により遺伝子改変巨核球や血小板産生システムのプロトコール確立を行った。

B. 研究方法

(1) 抗血小板薬不応の評価法の最適化 : responder, non-responder の評価は患者だけでなく、健常人の血小板に in vitro で抗血小板薬を直接添加してその効果の違いを直接比較する必要がある。従って、対象者は(a)抗血小板薬服用者、(b)健常人、である。血小板機能の評価として(a)PFA-100、(b) Gorog Thrombosis Testの2つを用いた。前者では、クエン酸採血後、ASA (vehicle, 10 μ M, 30 μ M) を in vitro で添加し、PFA-100[®] (Dade) Collagen/Epinephrin カードリッジの閉塞時間を測定した。ASA 10 μ M 添加時に、閉塞時間が300秒 (カットオフ時間) のグループと300秒未

満のグループに分け、それぞれを感受性グループ、低感受性グループとした。後者Gorog Thrombosis Test (GTT, Montrose Diagnostics, UK)は、抗凝固剤無添加native bloodを用いた血栓形成能評価法の一つである。GTTにおいて高ずり応力で活性化された血小板は下流の低ずり条件下で凝集塊を形成、凝集塊は更に下流の間隙を閉塞し血流を停止させる。その後、線溶の活性化に伴う血栓溶解により血流の再開が得られる。よって、閉塞時間は流動状態下での血小板血栓形成能の指標とされる。採血直後の全血を用いてGTTによる閉塞時間を測定した。

(2) 血小板の transcriptome 解析：健常人の血液 65mL から遠心分離により得た血小板多血漿を白血球除去フィルターに通した。白血球は多量の RNA を含むため、はじめに白血球除去の検討を行なった。フィルター処理無し、フィルター処理 1 回、フィルター処理 2 回、のそれぞれのサンプルの血小板数と RNA 量を検討後、それぞれの RNA が含む血小板、白血球の解析を特異マーカーの CD41、CD20 の解析用プライマーを用いてリアルタイム定量 PCR 解析を行った。さらに白血球については、細胞 10^6 個から分離した RNA $1\mu\text{g}$ が 100%の効率で cDNA になったと考え、その cDNA の 1/2 順

次希釈系列サンプルと CD20 を検出プローブとして行なったリアルタイム定量 PCR の結果から鑄型サンプル (RNA 100ng) が含む白血球数の計算を行なった。赤血球の混在を検討するため、上記法のフィルター処理 1 回、2 回のサンプルに加えて赤血球特異マーカー CD71 を用いた磁気ビーズ・negative selection 法を行なった。Microarray 解析は白血球除去フィルター 2 回血小板と白血球から抽出した RNA から cRNA を作成し、そのビオチン標識後に fragment 化したサンプルを対象に行なった。

(3) 抗血小板薬に対する responder、non-responder における microarray 解析：抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出するために、健常人からの血液（クエン酸採血）に in vitro でアスピリンを添加 (vehicle, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$) 後、血小板機能評価機器 PFA-100® (Date 社) collagen/ epinephrin カードリッジの閉塞時間を測定した（血管内の血流を想定した条件下で行うこの血小板機能評価法はこれまでにアスピリン不応の検出が可能であることが報告されている）。本研究ではアスピリン $10\mu\text{M}$ 添加時に、閉塞時間が 300 秒（カットオフ時間）の群と 300 秒未満の群に分け、それぞれを感受性群、低感受性群とした。それぞれの

群において、約 11,000 種類の遺伝子多型が検出できる microarray を用いて網羅的検討を行い、感受性群と低感受性群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。

(4) 抗血小板服用者に対する responder、non-responder における microarray 解析結果に基づいた遺伝子多型解析：抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出するために、抗血小板薬服用者からの血液（クエン酸採血）に血小板機能評価機器 PFA-100®（Date 社）collagen/ epinephrin カードリッジおよび collagen/ ADP カードリッジの閉塞時間を測定した（血管内の血流を想定した条件下で行うこの血小板機能評価法はこれまでにアスピリン不応の検出が collagen/ epinephrin カードリッジ使用時の閉塞時間の値を用いることで可能であることが報告されている）。本研究では collagen/ epinephrin カードリッジでの閉塞時間が 250 秒以上の群と 250 秒未満の群に分け、それぞれを good responder 群、poor responder 群とした。それぞれの群において、約 11,000 種類の遺伝子多型が検出できる microarray を用いて網羅的検討を行い、両群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。

(5) 血小板膜受容体 GPIb alpha の遺

伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響：健常人からの血液（クエン酸採血）に *in vitro* でアスピリンを添加（vehicle, 10 μ M）後、血小板機能評価機器 PFA-100®（Date 社）collagen/ epinephrin カードリッジおよび collagen/ ADP カードリッジの閉塞時間を測定した。本研究ではアスピリン 10 μ M 添加時に、閉塞時間が 250 秒以上の群と 250 秒未満の群に分け、それぞれを good responder 群、poor responder 群とした。両群において、GPIb alpha の -5T/C 遺伝子多型と 145Thr/Met 遺伝子多型の遺伝子型の分布の差異を検討した。

(6) 血小板 VWF 受容体 GPIb alpha 多型と血小板機能の関連：血栓形成能に関与する因子のひとつとして、血小板の膜糖蛋白 (GP; glycoprotein) Ib alpha beta/IX/V 複合体に着目した。フォンウィルブランド因子 (VWF; von Willebrand factor) の受容体であるこの複合体の GP Ib alpha サブユニットはその細胞外の N 末端から 45kDa (アミノ酸 1-300) の中に VWF との結合部位を有している。GP Ib alpha と VWF の反応は必ず応力依存性に血小板の活性化を引き起こす。したがって速い血流状態下の血栓である動脈血栓の形成時において GP Ib alpha は重要な役割を演じていると考えら

れている。GPIIb/IIIa は $^{145}\text{Thr}/\text{Met}$ 、それと連鎖不均衡の $^{397}\text{Pro}-^{409}\text{Gln}$ の 1-4repeat (R) の繰り返し配列の遺伝子多型を有している (^{145}Thr と 1R、2R の連鎖・ ^{145}Met と 3R、4R の連鎖)。これまでに我々や他の研究グループは ^{145}Met と 4R 遺伝子多型が冠動脈疾患の有病率や重症度・脳血管障害の危険因子であることを疫学研究結果により示している。VWF 反応への影響を検討するために遺伝子組換えたんぱくを用いた実験研究を行った。

(7) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) : hTERT のプロモーター領域約 1.6kb の全遺伝子配列の解読を 17 人の白血球から抽出した DNA を対象に行い、 $^{-1327}\text{C}/\text{T}$ 遺伝子多型を検出した(研究結果、参照)。 $^{-1327}\text{C}/\text{T}$ 遺伝子多型が hTERT の転写活性に与える影響を検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイ用ベクター (それぞれの遺伝子多型を有する hTERT のプロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼ発光ベクター) を遺伝子導入効率を補正するためのベクターとともに正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に導入し 48 時間培養後、そのルシフェラーゼ発光を定量解析した。

次にこの多型のテロメア長に対する影響を検討した。年齢がマッチするように $^{-1327}\text{T}/\text{T}$ 型と $^{-1327}\text{C}/\text{C}$ 型から 24

人、22 人をそれぞれ選び白血球より抽出した DNA を対象にサザンブロット法 (Hinf I 制限酵素処理 DNA に ^{32}P 標識-テロメア配列をハイブリダイゼーション) にてテロメア長の算出を行った。

$^{-1327}\text{C}/\text{T}$ 遺伝子多型と CAD の関係を検討するための疫学研究を行った。CAD 患者 104 名とその患者群と年齢や性別を一致させるように選ばれた健常人 115 名における遺伝子型の頻度を検討した。さらに CAD 患者におけるテロメア長の解析を行った。

(8) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の冠動脈内皮細胞における役割 : 正常冠動脈内皮細胞に hTERT 遺伝子導入を行った後、2.5h から 168h の間で細胞から RNA を抽出し real-time 定量 PCR を施行した。その結果 5h と 48h で hTERT の RNA 量に変化が認められたため、hTERT 遺伝子導入された正常冠動脈内皮細胞の 5h 後と 48h 後からのそれぞれの RNA を対象にマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を網羅的に行った。

(9) hTERT 遺伝子多型が冠動脈疾患患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討 : 104 名の冠動脈疾患患者から白血球 DNA を抽出し、hTERT-1327T/C 遺伝子多型の genotyping し、白血球 DNA テロメ

ア長をreal-timePCR法（TRAP法）を用いて解析した。そして、-1327T/C 遺伝子多型とテロメア長の関係を検討した。

(10) 全ゲノム解析：質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ技術（MSチップ）の開発とゲノムワイドな多型マイクロサテライト30,000個の設定と各対立遺伝子の頻度の検索に関する研究を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健常者100人の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit（QIAGEN）を用いてゲノムDNAの抽出・精製を行った。自動シーケンサーABI 3700 または3730 DNA analyzerにて電気泳動により、多型検索を行った。また多型マイクロサテライトの抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究については公開されている整列済みヒトゲノム配列データを利用して収集済み多型マイクロサテライトの位置を決定し、それまで未設定であった領域に効率よく設定が行えるよう、多型マイクロサテライトの抽出アルゴリズムを改良した。

(11) case-control study：脳血管障害患者群とコントロール群におけるmicroarray解析による疾患関連遺伝子多型の検索：平成17年度、脳血管障害と関連する遺伝子多型を検出す

るための研究を行った。脳血管障害患者40名とその患者群と年齢や性別を一致させるように選ばれたコントロール90名におけるDNA解析を約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用いて網羅的検討を行い各群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。そして平成18年度は本解析の患者数を増やして再解析を行った。脳血管障害患者80名とその患者群と年齢や性別を一致させるように選ばれたコントロール97名において、各群で頻度の異なる因子を解析した。

(12) LOX-1遺伝子多型解析：慶應義塾大学病院に通院中の発症時70歳以下の虚血性脳卒中患者（アテローム硬化性脳梗塞、ラクナ梗塞、一過性脳虚血発作）235名（年齢 58.7 ± 4.4 歳、 $\text{mean} \pm \text{S. D.}$ ）と年齢、性別を一致させた健常人274名（年齢 58.3 ± 7.8 歳）より静脈血採血を行った。但し、心原性脳塞栓症は対象から除外した。LOX-1(OLR1)遺伝子のG501Cのミスセンス-遺伝子多型について、末梢血リンパ球より抽出したDNAを用いてPCR法で453bpの遺伝子を増幅しSNuP法にてタイピングした。

(13) 新規 dual specificity phosphatase (DSP)の同定：発現ベクターの構築と変異体の作成はpolymerase chain reaction (PCR)に基づく方法

で行い、DNA シークエンスによりその配列を確認した。大腸菌由来の組換えタンパクの精製には、pGEXおよび pET-32b ベクター発現システムにより、glutathione S-transferase (GST) および His tagタンパクを発現させ、各々グルタチオンセファロース4B および Ni-アガロースを用いてアフィニティ精製した。細胞への遺伝子導入には、リポフェクタミンを用いた。免疫沈降には適切な抗体を結合したプロテインG-セファロースを用いた沈降反応を行い、SDS-PAGE後、Western blottingにより解析した。レポーターアッセイは、MEF2の転写活性に基づいた遺伝子発現を、レポーターとしてホタル由来ルシフェラーゼ発現ベクターpMEF2-Lucを用い、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ発現ベクターpRL-TKを共発現させトランスフェクション効率を補正する dual-luciferase assay system により行った。

(14) チロシン脱リン酸化酵素 dual specificity phosphatase(DSP)の酸化ストレスによる構造変化：発現ベクターの構築と変異体の作成は polymerase chain reaction (PCR) に基づく方法で行い、DNA シークエンスによりその配列を確認した。大腸菌由来の組換えタンパクの精製には、pGEX (Amersham Biosciences)

ベクター発現システムにより、glutathione S-transferase (GST) 融合タンパクを発現させ、グルタチオンセファロース 4B (Amersham Biosciences) を用いてアフィニティ精製した。哺乳動物発現ベクターには、SR α プロモーターを有する pMEベクターを用い、DSPs の N 末に Myc タグあるいは HA タグが適切に付加されるようにベクター構築を行った。脱リン酸化酵素活性の測定は、50mM imidazole (pH 7.5) に DSPs の組換えタンパクを加え、基質として 20mM *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) を用いて、37°C、1 時間にて加水分解反応を行い、405nm における吸光度を計測することで行った。

哺乳動物細胞の培養においては、HeLa 細胞株を用い、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に 10%仔ウシ血清と L-グルタミン、抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を添加し培養した。また、HeLa 細胞への遺伝子導入には、リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いた。細胞抽出液の調整は、細胞溶解バッファーとして 20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、12mM beta-glycerophosphate、1mM sodium orthovanadate、2mM EGTA、3mM dithiothreitol (DTT) 及び protease inhibitor mixture

(Complete, Roche Diagnostics) を含むバッファーを用いて調整し、その後、DC Protein Assay kit (Bio-Rad) にてタンパク濃度を測定することで解析サンプルとした。タンパク発現の確認は、還元剤である DTT あるいは β -mercaptoethanol (β -ME) を含む Laemmli バッファーにてサンプル調整し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、Western blotting にて行った。また、非還元状態のタンパクの検出は、上記 Laemmli バッファーに還元剤を加えずにサンプル調整を行い、SDS-PAGE (非還元 SDS-PAGE) 後、Western blotting にて行った。免疫沈降物の解析は、細胞溶解バッファーによる細胞抽出液に、適切な抗体を結合したプロテイン G-セファロース (Amersham Biosciences) を加え沈降反応を行い、SDS-PAGE 後、Western blotting により行った。

(15) 血小板ミトコンドリア遺伝子多型検索の基礎検討：ヘパリン処理をした血液から遠心分離法を用いて得た血小板多血漿 (PRP) を白血球除去フィルターに通した。その PRP からミトコンドリア DNA の抽出はアルカリ変成・環状 DNA 抽出法に基づきデザインされた市販のキットを用いた。血小板ミトコンドリア DNA を鋳型とした PCR による増幅反応 (全長

16kb) を行った。

(16) 脳梗塞患者の臨床像の解析：慶應義塾大学病院神経内科に入院した脳卒中患者のデータベースより神経学的に一側上肢遠位部の運動麻痺のみを呈した症例を抽出し頭部MRIについて病巣の比較検討を行った。

(17) 文献・データベース検索：脳梗塞に対する抗血小板薬の臨床試験結果の報告を文献検索し、それぞれの薬剤について臨床的な有効性を調査検討した。

(18) 慢性期脳梗塞における抗血小板薬の服用状況と血小板機能の検討：平成 18 年 5 月より 12 月までの間に神経内科専門外来にて通院中の脳血管障害患者のうち抗血小板薬を内服している患者を対象とし、血小板機能の測定と遺伝子多型の研究の同意を得た症例を観察集団として登録を行った。なお、血小板機能の測定のため抗凝固薬内服症例は除外した。登録された症例についてその背景と抗血小板薬の内服内容、測定された血小板機能の結果を解析した。

(19) マウス ES 細胞を用いた血小板機能解析：ES 細胞から in vitro 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞と共培養を行ない、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分

化誘導を行なうためのサイトカインであるトロンボポエチンを加え 15 日間培養を行なう方法である。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー (CD41) の発現や核の倍数 (DNA ploidy) をフローサイトメトリー法にて行なった。血小板の機能検討はリガンド (フィブリノーゲン) との結合試験を行なった。細胞を血小板活性化物質のトロンビンで刺激後、フィブリノーゲンと反応させてフローサイトメトリーで検討した。分化誘導により得られた細胞から抽出した RNA から cRNA を作成し、そのビオチン標識後に fragment 化したサンプルを対象に microarray 解析を行なった。

(20) マウス ES 細胞を用いた血小板の産生機序の解明とその血小板の機能解析 : ES 細胞から *in vitro* 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞 (大理石病マウスのストロマ細胞) と共培養を行ない、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分化誘導を行なうためのサイトカインであるトロンボポエチンを加え 15 日間培養を行なう方法である。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー (CD41) の発現や核の倍数 (DNA ploidy) をフローサイトメ

トリー法にて行なった。血小板の機能検討はリガンド (フィブリノーゲン) との結合試験をアスピリン存在下、あるいは非存在下で行った。細胞を血小板活性化物質のトロンビンあるいは ADP で刺激後、フィブリノーゲンと反応させてフローサイトメトリーで検討した。

微量サンプル (従来量の約 1/130) を用いての microarray 解析は array の販売元である affymetrix のプロトコルに従い、ES 由来血小板 RNA から PCR 増幅を行い microarray 解析を行った。

アポトーシスに関しては各分化誘導過程から得たサンプルに対して TUNEL 法による検討、caspase の活性化を種々の抗体 (caspase 3、6、7、9、10、12) を用いるウエスタンブロットにて検討した。また caspase 阻害剤添加の条件で分化誘導を行い血小板産生に与える影響を検討した。

(21) マウス ES 細胞、ヒト造血幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング巨核球・血小板産生システムのプロトコルの確立 : ES 細胞から *in vitro* 分化誘導により巨核球や血小板を得るために OP9 培養システムを用いた実験を行なった。このシステムはマウス ES 細胞を OP9 細胞 (大理石病マウスのストロマ細胞) と共培養し、培養 5 日目から巨核球・血小板へ分化

誘導を行なうためのサイトカインであるトロンボポエチンを加え 15 日間培養する方法である。ヒト造血幹細胞としてのヒト CD34 陽性細胞は cambrex 社より購入した。CD34 陽性細胞にはトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムを用いて巨核球分化、血小板産生のための *in vitro* 分化誘導を約 15 日間行った。巨核球・血小板産生の評価は形態観察に加え、その特異マーカー(CD41)の発現や核の倍数(DNA ploidy)をフローサイトメトリー法にて行なった。

マウス ES 細胞を用いた OP9 培養システムにおいて、培養 5 日目(mesodermal cells に相当)の細胞に条件検討用に市販されている FITC-GADPH-siRNA をリポフェクタミン法、エレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った。ヒト CD34 陽性細胞はトロンボポエチン存在下 Serum-free liquid culture システムにて培養 4 日目に GPIb alpha に対する siRNA、negative control siRNA、GPIb alpha の発現ベクター(PCDNA3.1hygro(+))と PCDNA3.1hygro(+)-ベクター、ヒトテロメラーゼ逆転写酵

素(hTERT)の発現ベクター(pCL neo)と pCL neo ベクターをエレクトロポレーション法にて導入した。導入評価は遺伝子導入細胞から 48 時間後に抽出した RNA に対するリアルタイム定量 PCR あるいはフローサイトメトリー法にて行った。

(22) 超微細構造像による巨核球分化と血小板産生の研究：マウス ES 細胞およびヒト CD34 陽性細胞をそれぞれ巨核球・血小板に *in vitro* 分化誘導を行い、その培養 5 日目、8 日目、12 日目、15 日目の細胞を電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察した。免疫電子顕微鏡観察には抗 GPIb alpha 抗体、抗 GPIb beta 抗体、抗 GPIIb 抗体、抗 von Willebrandfactor 抗体、抗 fibrinogen 抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究であり、合同指針の則り施設の倫理委員会で承認を受けた。すべての検体提供者から十分な説明の後インフォームドコンセントをえた。検体はすべて匿名化した後解析された。

C. 研究結果

(1) 抗血小板薬不応の評価法の最適化：

PFA-100：検診受診者73人を調べた結果、感受性グループは60人(82%)、

低感受性グループは13人（18%）であった。低感受性グループではvehicle添加時のPRP比濁法（コラーゲン刺激）での凝集率が高く、TXB₂産生量も多い傾向があった。

GTT：閉塞時間は年齢、性別、BMI、血圧、喫煙、飲酒とは有意に関連しなかった。又、血小板数やフィブリノーゲンとも有意な相関を認めなかった。一方、フォンビルブランド因子（VWF:AgおよびVWF:RCo）、ヘマトクリット、及びHbA_{1c}と負の相関を認めた（ $p < 0.05$, 単回帰分析）。重回帰分析ではVWF:RCoとヘマトクリットがOTと有意に関係していた。その他の動脈硬化危険因子と閉塞時間の間に有意な相関は認めなかった。

(2) 血小板のtranscriptome解析：

白血球混在についての検討結果は分離の精製度を1ランク上げると血小板数は約1/2ずつ、混在白血球の数は約1/2000、約1/15と減少を示した。RNA量は遠心分離のみに比べるとフィルター1回で約3/4量、フィルター2回で1/8量となったがこれらはいずれも本課題研究に用いるmicroarray解析サンプルの条件として決められているRNA量と質（たんぱく混入の量）を満たしていた。この方法による結果は同一個体での再現性と異なる個体での再現性を示した。また本検討から鑄型サンプル中、白血球48.8個

以下の混在で本定量PCRでの検出限界となることが分かった。

赤血球混在の検討結果はフィルター処理1回のサンプルにこの方法を加えた時、血小板数は変化なし、フィルター処理2回のサンプルにこの方法を加えると血小板数は約1/200減少となった。RNAに関しては、RNA計測に用いる波長測定の際、含有たんぱく量に相当する280nmでの数値が高く、本課題研究に用いるmicroarray解析サンプルの条件として決められているRNA中のたんぱく混入の規定に達しなかった。赤血球は減少を示したがリアルタイム定量PCRによる値は一定しなかった。

Microarray解析は白血球除去フィルター2回血小板と白血球を対象に行なった。約20,000因子搭載のmicroarray解析の結果、白血球サンプルに対して血小板サンプルで増加している既知因子を同定した。

(3) 抗血小板薬に対するresponder、non-responderにおけるmicroarray解析：検診受診者の血液をPFA-100 collagen/epinephrinカートリッジを用いてアスピリン存在下、非存在下にて検討を行い、感受性群8名と非感受性群3名を認めた。各群あわせた11名から得たそれぞれのDNAサンプルにおいて約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用い

て網羅的検討を行った。統計解析により感受性群と非感受性群の間で有意に頻度の異なる(p value<0.001)遺伝子多型の上位10位のなかで遺伝子名が記載されているものは3種類で4位のreceptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、8位のmannosidase alpha、9位のpotassium voltage-gated channelであった。また、この上位10位の中で染色体11に存在するものが4つ認められた。

(4) 抗血小板服用者に対するgood responder、poor responderにおけるmicroarray解析結果に基づいた遺伝子多型解析：抗血小板薬の反応性に関与する遺伝子多型を検出するために、抗血小板薬服用者からの血液（クエン酸採血）に血小板機能評価機器PFA-100®（Date社）collagen/epinephrin カードリッジおよびcollagen/ADPカードリッジの閉塞時間を測定し、collagen/epinephrin カードリッジでの閉塞時間が250秒以上の群と250秒未満の群に分け、それぞれをgood responder群、poor responder群とした。抗血小板薬服用者80名を対象に検討を行った結果、22名がpoor responderであった。抗血小板薬服用者のほとんどはアスピリン服用の為に詳細な解析はアスピリン服用者に着目して行った。それ

ぞれの群において、約11,000種類の遺伝子多型が検出できるmicroarrayを用いて網羅的検討を行い、両群の間で有意に頻度の異なる遺伝子多型の検出を行った。平成17年度の健常人サンプルに*in vitro* アスピリン添加時のcollagen/epinephrinカードリッジでの閉塞時間によりgood responder群、poor responder群とした場合に行った解析と同様の解析を行った。平成17年度、18年度いずれの解析においても有意差を認めた因子はReceptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1、Mannosidase alpha、Potassium voltage-gated channel 1、Tumor protein D52、p53-inducible protein、SLIT and NTRK-like family member 4であった。これらのなかでTumor protein D52はチクロピジンに対する感受性にも関連を示した。

(5) 血小板膜受容体 GPIb alpha の遺伝子多型が血小板のアスピリン反応性に及ぼす影響(表 1A、表 1B)：GPIb alpha の2つの遺伝子多型-5T/Cと145Thr/Metそれぞれとアスピリンgood responder、poor responderの関係を検討した結果、-5T/Cとアスピリン反応性の関係は認められなかった(p=0.1831)。一方、145Thr/Metの145Metを有する血液サンプルは145ThrThrのものに比

し有意に poor responder の頻度が低かった (p=0.0072)。この結果は 145Met とアスピリン good responder の関連が強い、すなわち 145Met ではアスピリンの反応性が良いことを示唆している。

表1A. -5T/C遺伝子多型とアスピリン反応性

	-5TT n (%)	-5TC+CC n (%)	p value
Good responder	72 (53.3)	63 (46.7)	0.1831
Poor responder	17 (41.5)	24 (58.5)	

表1B. 145Thr/Met遺伝子多型とアスピリン反応性

	145TT n (%)	145TM+MM n (%)	p value
Good responder	98 (72.6)	37 (27.4)	0.0072
Poor responder	38 (92.7)	3 (7.3)	

T: Thr、M: Met

今回用いた血小板機能評価法PFA-100の値は血小板数、ヘマトクリット、VWF抗原量に影響を受けることが知られているため、これら値と 145Thr/Met遺伝子多型を独立変数、good responder vs poor responder

を従属変数とした多変量解析を行った。その結果、145Thr/Met多型とVWF抗原量はアスピリン反応性に対する独立した因子であることが示された。アスピリンを添加しない場合、VWF抗原量で補正したcollagen/epinephrinカードリッジおよびcollagen/ADPカードリッジの閉塞時間は-5T/Cと145Thr/Metいずれとも関連は認めなかった。

(6) 血小板 VWF 受容体 GPIbalpha 多型と血小板機能の関連 :

145Tと145Mを固相化したニトロセルロース膜に¹²⁵I標識VWFをリストセチン存在下で反応させ、その放射活性カウントによる定量解析を行った結果、¹²⁵I標識VWFと組み換え蛋白の反応は145Tと145Mの比較検討において有意差は認められなかった。結合親和性(Kd)の検討においても145Tと145Mの比較検討における有意差は認められなかった。2つめの実験研究、流動状態下において、ガラス板に固相化したVWFと細胞の反応を細胞のrolling velocityの検討結果は、145M/4Rが145T/1Rに比し有意差をもってVWFと高い反応を示した(p=0.00042)。145T/4R、145M/1Rは前述2つの中間の値を示し、これら間にVWF反応の差異は認めなかった。

(7) hTERT :

17人の白血球から抽出したDNAを対

象に hTERT のプロモーター領域約 1.6kb の全遺伝子配列の解読を行った結果、翻訳開始より 1375 塩基上流の C/T 塩基置換を 2 検体から検出した。さらに解析検体数を 46 としてこの遺伝子置換の頻度を検討した結果、⁻¹³²⁷C/C 型 45.8%、⁻¹³²⁷C/T 型 39.0%、⁻¹³²⁷T/T 型 15.2%であった。⁻¹³²⁷C/T 置換は集団の 1%以上に存在するため遺伝子多型であることが認められた。

⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型が hTERT の転写活性に与える影響を検討のルシフェラーゼアッセイの結果、⁻¹³²⁷T/T 型は ⁻¹³²⁷C/C 型に比し転写活性が高かった (p=0.00026)。

次にこの多型のテロメア長に対する影響を検討した。年齢がマッチするように ⁻¹³²⁷T/T 型と ⁻¹³²⁷C/C 型から 24 人、22 人をそれぞれ選び白血球より抽出した DNA のテロメア長は ⁻¹³²⁷C/C 型群ではテロメア長と年齢の逆相関が認められた (R=0.48、p=0.0245) が、⁻¹³²⁷T/T 型群ではその逆相関は認められなかった (R=0.14、p=0.529)。したがって解析を 50 才以上の集団とした結果、⁻¹³²⁷T/T 型群でのテロメア長 (kb) (8.96±1.45) は ⁻¹³²⁷C/C 型群でのそれ (7.60±0.71) に比し有意差をもって長いことが認められた (p=0.0470)。

⁻¹³²⁷C/T 遺伝子多型と冠状動脈疾患の関係を検討するための疫学研究を行った。冠状動脈疾患患者 104 名で

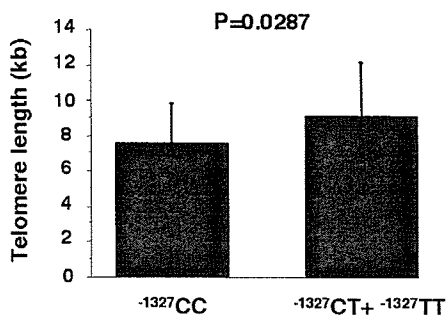
の ⁻¹³²⁷C/C 型の遺伝子型頻度 (51.9%) は健常人 115 名でのそれ (36.5%) に比し高いことが示された (p=0.0218)。また、患者群において重症度別に遺伝子型の頻度を検討した結果、重症度が高くなるほど ⁻¹³²⁷C/C 型の遺伝子型頻度が高くなることが認められた。

さらに冠状動脈疾患患者におけるテロメア長の解析を行った。50才以上の冠状動脈疾患患者の白血球DNAのテロメア長 (6.93±1.19) を解析して年齢がマッチする健常人群のテロメア長 (8.28±1.31) を比較解析した結果、患者群で有意に短かった (p=0.0137)。

(8) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の冠状動脈内皮細胞における役割 : hTERT 遺伝子導入されていない正常冠状動脈内皮細胞に比し、その遺伝子導入細胞において発現が減少の上位20位から血栓に関連する因子を検索した結果、intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)、von Willebrand factor (VWF) を認めた。また、ICAM2 と VWF それぞれのプロモーター活性調節因子のなかで hTERT 遺伝子導入とともに発現変化を示したものを検索した結果、ICAM2 は caspase 1、VWF は GATA6 を認めた。さらに ICAM2 と VWF の遺伝子発現減少は real-time 定量 PCR により確認された。

(9) hTERT 遺伝子多型が冠状動脈疾

患者における白血球テロメア長に及ぼす影響の検討 (図 1): 104 名の冠動脈疾患患者から白血球 DNA を抽出し、hTERT-1327T/C 遺伝子多型の genotyping の結果、-1327TT+ -1327TC は 50 名(48.1%)、-1327CC は 54 名(51.9%) であった(この-1327CC 遺伝子型の頻度は general population のものと比べ高く、冠動脈疾患の危険因子として報告している)。冠動脈疾患患者における白血球テロメア長を real-time PCR 法を用いて解析し、-1327T/C 遺伝子多型とテロメア長の関係を検討した結果、-1327CC では-1327CT+TT に比し有意に短いテロメア長を示した。



(10) 全ゲノム解析: ゲノムワイドに収集した約 30,000 個の多型マイクロサテライトについて、迅速な PCR 増幅産物の分子量測定を可能とする、高密度にサンプルを搭載した MS チップ作成のため、MALDI-TOFMS 用

サンプルを微小スポットに搭載するためのスポットティング条件を検討した結果、1,000 スポット/cm 画密度をもつチップの作製に成功した。また、この高密度 MS チップ (微小スポット) におけるイオン化条件の検討を行っており、一部条件下において分子量の測定が可能となった。現在、これら高密度 MS チップ搭載時の測定を自動的に行うにあたって、サンプルプレート動作制御を行う試作機器の開発を行っている。

MALDI-TOFMS の手法によってマイクロサテライトの多型を識別するために重要な、分解能向上のために、イオン化時に発生するフラグメンテーションを抑制する生化学的手法の検討をさらに推し進めた。これまで、同手法では PCR 増幅効率の低下が問題となる場合が認められたが、アニーリング温度の検討、使用酵素の検討により、通常 70%程度と、分子量測定に十分な増幅量が得られる温度条件を見出した。

マイクロサテライトを検索するものとなる整列化ゲノム配列には、Human Genome Project の成果によるもの (GoldenPath (<http://genome.ucsc.edu/>)) を使用した。昨年度までに多型マイクロサテライトが設定できていない領域を検索し、それらのゲノム領域についてマイク

ロサテライトの検出、PCR 増幅を行うためのプライマー設計を行った。健常人血液サンプルを用いて遺伝子解析を実施するにあたっては、東海大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で審査を受け、研究実施の承認を受けた上で、研究開発を行った。本研究への参加について同意を得られた日本人健常人 100 人（男性 45 人、女性 55 人）のボランティアより各 10~20 mL の末梢血を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA の抽出・精製を行った。次に、昨年度と同様の手順にて DNA 定量及び混合 DNA (Pooled DNA) 溶液の調製を行った。この DNA サンプルについて、設計したプライマーセットによって PCR 増幅を行い、自動シーケンサーABI 3700 DNA analyzer にて電気泳動に供した。得られた蛍光シグナルの波形パターンから、各マイクロサテライトマーカの多型有無を判定した。多型有りと判定されたマーカについては、検出されたピーク数より対立遺伝子数をカウントし、全ピークの高さの和に対する各ピークの高さの比率から、推定対立遺伝子頻度及びヘテロ接合率を算出した。これらの多型マイクロサテライトについては、随時整列化ゲノム配列上での位置を検索すること

によって、最新のゲノム配列における設定状況を反映しつつ新規設定作業を行えるものとした。現在、34,270 個を収集することができた。現在、ヒトゲノム上に多くの遺伝的多型マーカが同定され、これを利用したゲノムワイド連鎖不平衡マッピングによって、多遺伝子性疾患関連遺伝子の同定が試みられようとしている。一方で、そのような解析に必須となる人類集団のゲノムワイドな遺伝的特性に関する知見は少なく、特に日本人など東アジア人は比較的均質な遺伝的背景を持つとされているが、詳細な情報は非常に少ない。そこで、本研究では、日本人、韓国人、ハルハモンゴル人、ヨーロッパ系アメリカ人の 4 集団について、Y 染色体から 26 個、X 染色体上から 9 個、常染色体上から 24 個の多型マイクロサテライトを用いて対立遺伝子遺伝子頻度分布の比較を行い、集団の遺伝的特性に関する調査を行った。4 集団間の対立遺伝子頻度分布の比較から、Y 染色体 26 マーカーに関しては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカが 8 座位 (30.8%) であったのに対し、他の集団ペア間では 61.5-88.5%の座位で有意差が認められた。また、常染色体 24 マーカーにおいては、日本人-韓国人集団間で有意差を示すマーカは 1 座位